



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

EVALUACIÓN DEL USO DE ULTRASONIDOS COMO OPERACIÓN PRELIMINAR Y SUS EFECTOS SOBRE LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL BRÓCOLI

Trabajo de final de grado

Ingeniería alimentaria

Autor: Sonia Raquel Rojas Gonzales

Tutores: Montserrat Pujolà Cunill

Isabel Achaerandio

Julio del 2019

RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) es reconocido como un alimento muy nutritivo debido a su alto contenido de compuestos que promueven la salud, como el ácido ascórbico, los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante. El sector alimentario cada vez tiene más tendencia a los productos mínimamente procesados, los cuales requieren de una seguridad alimentaria pero que a la vez mantengan unas características organolépticas adecuadas, utilizando tecnologías que puedan sustituir el tratamiento térmico, una alternativa podría ser la aplicación de ultrasonidos.

El presente trabajo estudia la aplicación de los ultrasonidos como pre-tratamiento para la obtención de brócoli mínimamente procesado. El objetivo es evaluar el efecto de los US (40 kHz) durante 3, 6, 10 minutos sobre los compuestos bioactivos del brócoli comparándolo con el proceso de escaldado (3 minutos, $98\pm 0.2^{\circ}\text{C}$).

Los ultrasonidos han resultado un método equivalente al escaldado en cuanto al contenido de vitamina C, ya que presenta una pérdida entre 48-55% respecto al crudo, mientras que el escaldado presenta una pérdida del 53%. Aunque hay diferencias significativas entre ambos tratamientos, estas no tienen repercusión a nivel nutricional ($p < 0.05$). En cambio, los ultrasonidos son un buen método para mantener los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, ya que retienen un 70% de compuestos fenólicos y un 90% de su capacidad antioxidante, respecto al 50% de retención de compuestos fenólicos y 55% de capacidad antioxidante del brócoli escaldado. El pH y la temperatura del medio en ultrasonidos no presentan grandes oscilaciones independientemente del tiempo de aplicación.

Palabras clave: *Brassica oleracea*, ultrasonidos, ácido ascórbico, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

RESUM

El bròquil (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) és reconegut com un aliment molt nutritiu a causa del seu alt contingut de compostos que promouen la salut, com l'àcid ascòrbic, els compostos fenòlics i la seva capacitat antioxidant. El sector alimentari cada vegada té més tendència als productes mínimament processats, els quals requereixen d'una seguretat alimentària però que alhora mantinguin unes característiques organolèptiques adequades, utilitzant tecnologies que puguin substituir el tractament tèrmic, una alternativa podria ser l'aplicació d'ultrasons.

El present treball estudia l'aplicació dels ultrasons com pretractament per a l'obtenció de bròquil mínimament processat. L'objectiu és avaluar l'efecte dels ultrasons (40 kHz) durant 3, 6, 10 minuts sobre els compostos bioactius del bròquil comparant-lo amb el procés d'escaldat (3 minuts, 98 ± 0.2 °C).

Els ultrasons han resultat un mètode equivalent al escaldat pel que fa al contingut de vitamina C, ja que presenta una pèrdua entre 48-55% respecte al bròquil cru, mentre que l'escaldat presenta una pèrdua del 53%. Encara que hi ha diferències significatives entre els dos tractaments, aquestes no tenen repercussió a nivell nutricional ($p < 0.05$). En canvi, els ultrasons són un bon mètode per mantenir els compostos fenòlics i la seva capacitat antioxidant, ja que retenen un 70% de compostos fenòlics i un 90% de la seva capacitat antioxidant, respecte al 50% de retenció de compostos fenòlics i 55% de capacitat antioxidant del bròquil escaldat. El pH i la temperatura del medi en ultrasons no presenten grans oscil·lacions independentment del temps d'aplicació.

Paraules clau: *Brassica oleracea*, ultrasons, àcid ascòrbic, compostos fenòlics, capacitat antioxidant.

Abstract

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) is recognized as a very nutritious food due to its high content of health promoting compounds, such as ascorbic acid, phenolic compounds and its antioxidant capacity. The food industry is increasingly in favor of less processed products, which require food safety but at the same time maintain adequate organoleptic characteristics, using technologies that can replace the heat treatment an alternative could be the application of ultrasound.

The project studies the application of ultrasound as a pre-treatment for obtaining minimally processed broccoli. The objective is to evaluate the effect of the Ultrasound (40 kHz) during 3, 6, 10 minutes on the bioactive compounds of broccoli comparing it with the blanching process (3 minutes, 98 ± 0.2 ° C). Ultrasounds have been a method equivalent to Blanch in terms of vitamin C content, since it presents a loss between 48-55% with respect to the raw product, while blanching presents a loss of 53%. Although there are significant differences between both treatments, these have no impact at the nutritional level ($p < 0.05$). On the other hand, ultrasounds are a good method to maintain phenolic compounds and their antioxidant capacity, since they retain 70% of phenolic compounds and 90% of their antioxidant capacity, with respect to 50% retention of phenolic compounds and 55% of Antioxidant capacity of blanch broccoli. The pH and the temperature of the medium in ultrasound do not show large oscillations regardless of the time of application.

Key words: *Brassica oleracea*, ultrasounds, ascorbic acid, phenolic compounds, antioxidant capacity.

Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Símbolos y acrónimos	8
Agradecimientos	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 El brócoli: características y composición.....	10
1.2 Pérdidas de calidad del brócoli durante el almacenamiento.....	12
1.3 Productos de IV GAMA en base a brócoli	13
1.4 Métodos de desinfección en los productos de IV gama	13
1.4.1 Tratamiento con cloro	14
1.4.2 Tratamientos alternativos.....	14
1.4.2.1 Tratamientos químicos.....	15
1.4.2.2 Tratamientos físicos	17
1.5 Los ultrasonidos	19
1.6 Aplicación y efecto de los ultrasonidos en frutas y hortalizas	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Materia prima.....	26
3.2 Equipo de ultrasonidos.....	26
3.3 Equipos de medida de temperatura y pH	26
3.4 Diseño experimental	27
3.5 Métodos analíticos.....	29
3.5.1 Determinación del contenido de ácido ascórbico (vitamina C)	30
3.5.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	31
3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante:	32
3.6 Análisis estadístico	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 Evolución de la temperatura interior del brócoli durante el tratamiento	35
4.2 Variaciones de pH y temperatura del agua durante el tratamiento.....	36
4.3 Efecto del escaldado y los ultrasonidos en el contenido de ÁCIDO ASCÓRBICO	37
4.4 Efecto del escaldado o los ultrasonidos en el contenido de COMPUESTOS FENÓLICOS	38
4.5 Efecto del escaldado o los ultrasonidos en la CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CUPRAC)	40

4.6 Efecto de la extracción: oxálico <i>versus</i> metanol	42
5. CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFIA	45

Índice de figuras

Figura 1. Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Italica</i>).....	10
Figura 2 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de vegetales de IV gama.	13
Figura 3. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad	19
Figura 4. Muestras de brócoli.....	26
Figura 6. Equipo de (US) utilizados.....	26
Figura 5. Muestras de brócoli,.....	26
Figura 7. Mezcla de flores de brócoli con 2cm de pedúnculo.....	27
Figura 8. Diseño experimental	28
Figura 9. Muestras de brócoli después de la filtración	29
Figura 10. Reacción de Folin-Ciocalteu	31
Figura 11. Determinación de fenoles totales. Recta de calibración. En el eje de abscisas se expresan los mg de ácido gálico y en el eje de ordenadas, la absorbancia a 760 nm.	32
Figura 12. Reacción del método de CUPRAC.	32
Figura 13. Determinación de la capacidad antioxidante. Recta de calibración.	33
Figura 14. Variación de la temperatura interior del brócoli (°C) durante la aplicación de los diferentes métodos.....	35
Figura 15. Efecto del tratamiento aplicado en el contenido de ácido ascórbico en el brócoli...	37
Figura 16. Compuestos fenólicos en el brócoli mediante método de Folin-Ciocalteu.	38
Figura 17. Capacidad antioxidante del brócoli mediante el método de Cuprac.....	40

Índice de tablas

Tabla 1. Composición nutricional del brócoli según su forma de presentación	11
Tabla 2. Compuestos fenólicos en brócoli crudo	12
Tabla 3. Tratamientos químicos aplicados en la desinfección de vegetales.....	15
Tabla 4. Tratamientos físicos aplicados en la desinfección de vegetales	17
Tabla 5. Mecanismos de inactivación de los ultrasonidos	21
Tabla 6. Efecto de los ultrasonidos en frutas y hortalizas.....	23
Tabla 7. Variación del pH del agua de brócoli durante la aplicación de escaldado y ultrasonidos	36
Tabla 8. Variación de la temperatura del agua de brócoli durante la aplicación de escaldado y ultrasonidos.....	36
Tabla 9. Comparación entre medios extractantes en la determinación de compuestos fenólicos	42
Tabla 10. Comparación entre medios extractantes en la determinación de CUPRAC.....	42

Símbolos y acrónimos

US	Ultrasonidos
μM	Micromolar
ANOVA	Análisis de varianza
g	Gramos
AGE	Ácido gálico equivalente
M	Concentración Molar
mg	miligramo
mg/100g	Miligramo por cien gramos
mg/g	Miligramo por gramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
TE	Equivalente de Trolox
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
μg	Microgramo
ACSA	Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria
ppm	Partes por millón
% v/v	Volumen/ volumen (volume per volume)
% w/v	Peso/ volumen (weight per volume)

Agradecimientos

Agradecer a las personas que han estado a mi lado durante este tiempo, Jose Carlos mi niño que me ayudado a esforzarme y darme cuenta de lo valioso que es el tiempo y poder compartirlo con las personas que quieres, porque es la persona que más ha sufrido mi ausencia durante estos años de estudio. A Juan Carlos por su apoyo constante y su ánimo en los momentos más difíciles. Y a mis padres por la educación que me han dado, de esfuerzo, constancia, respeto y de superación. En general a toda mi familia que a pesar de la distancia han estado allí para animarme y para hacer que yo crea en mis capacidades y me mantenga firme en mi objetivo.

A mis tutoras Isabel Achaerandio y Montse Pujolà, por su aportación, paciencia, generosidad, por compartir sus conocimientos, y por darme la oportunidad de hacer el TFG.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El brócoli: características y composición

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) pertenece a la familia de las Brassicaceae. Es una planta que tiene inflorescencias (ramificaciones y yemas florales) compactas y carnosas de color verde puestas en forma de árbol, los tallos de las inflorescencias poseen una textura suave. Las hojas son onduladas y con peciolo alargado, limbo foliar lobulado de color verde grisáceo y con lóbulos profundos. Las flores son pequeñas, unidas a los pedúnculos mediante pedicelos y tienen cuatro pétalos amarillos (Figura 1). El fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un único nervio longitudinal. Produce semillas redondeadas de color rosáceo. La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales (Rodríguez, 2013).



Figura 1. Brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)
Fuente: Internet. Botánico

El brócoli es la hortaliza con mayor valor nutritivo en relación al porcentaje de peso del producto comestible (Pascual, 1994); es rico en proteínas, azúcares sencillos y agua, lo cual le atribuye alto valor nutritivo y calidad dietética. Es uno de los vegetales más demandados por sus efectos beneficiosos para la salud, debido fundamentalmente a su gran cantidad en compuestos funcionales con propiedades antioxidantes como: La vitamina C, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos (Moreno et al., 2006). El aporte calórico es mínimo por su bajo contenido de almidón y azúcar (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutricional del brócoli según su forma de presentación

Composición nutricional por 100g de brócoli					
NUTRIENTES	unidades	Brócoli crudo	Brócoli congelado cocido	Brócoli cocido	Brócoli, flores crudo
Humedad	g	89.30	90.72	89.25	90.69
Energía	Kcal	34	28	35	29
Proteína	g	2.82	3.10	2.38	2.98
Ceniza	g	0.87	-	-	-
Fibra dietética	g	2.6	3.0	3.3	3.5
Azúcar total	g	1.70	1.47	1.39	1.48
Sacarosa	g	0.10	-	-	-
Fructosa	g	0.68	-	-	-
Glucosa	g	0.49	-	-	-
Lactosa	g	0.21	-	-	-
Maltosa	g	0.21	-	-	-
Calcio Ca	mg	47	33	40	47
Hierro Fe	mg	0.73	0.61	0.2167	0.85
Magnesio Mg	mg	21	13	21	28
Fosforo P	mg	66	49	67	71
Potasio K	mg	316	142	293	329
Sodio Na	mg	33	11	41	29
Zinc Zn	mg	0.41	0.28	0.45	0.40
Cobre Cu	mg	0.05	-	-	0.047
Manganeso Mn	mg	0.21	-	-	-
Selenio	µg	2.5			3.0
Vitamina C	mg	89.2	40.1	64.9	91.8
Vitamina B1, Tiamina	mg	0.071			
Vitamina B2, Riboflavina	mg	0.12	0.081	0.123	0.119
Vitamina B3, Niacina	mg	0.64	0.458	0.553	0.471
Ácido pantoténico	mg	0.57	-	-	-
Vitamina B6, Piridoxina	mg	0.18	-	-	-
Folatos	µg	63	56	108	71
Vitamina A (Retinol)	µg	31	51	77	30
Vitamina E (α-tocoferol)	mg	0.78	1.32	1.45	-
Vitamina k (filoquinona)	µg	101.60	88.1	141.1	-

Adaptado de (USDA, 2019)

Cabe destacar que la aplicación de un tratamiento térmico afecta más al contenido de los diferentes nutrientes que son compuestos solubles como potasio, sodio, vitamina C, estos experimentan una reducción de casi el 50%

En el brócoli los principales los compuestos fenólicos son: Ácidos fenólicos y glucósidos de la familia de kaempferol y quercetina (Moreno et al., 2006) y USDA (Tabla 2)

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos en brócoli crudo

Compuestos fenólicos en 100 g MF		
Polifenoles totales (Folin Ciocalteu)	198.5 mg ácido gálico	
Flavonoides	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucósido	1.4 mg
	Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	1.8 mg
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido clorogénico	1.8 mg

Adaptado de (USDA, 2019)

Cambios en el contenido de vitamina C se han observado a partir de estudios de pre-cosecha y post-cosecha indicando que, el ácido ascórbico no se degradó en cantidades significativas en el proceso de pre-cosecha, pero si se degradó rápidamente en el proceso de post-cosecha si no se almacenaba a temperaturas entre 1-6 °C. Por otra parte, también se comprobó que el brócoli era más termolábil que fotolábil mediante ensayos de exposición a radiación UV-A y UV-B entre 3 y 6 días. Ya que no se observaron disminuciones significativas en el contenido de vitamina C (Jin, Yao, Xu, Zheng, 2015).

1.2 Pérdidas de calidad del brócoli durante el almacenamiento

Los parámetros de calidad están basados en el tamaño y apariencia de la pella, que debe presentar un diámetro y grado de compactación adecuado, con todas las flores cerradas y de color verde oscuro brillante, el tallo corto y compacto (Fernández-León, 2012).

La pérdida de agua durante el almacenamiento afecta a su textura y es necesario no mezclarlo con productos que desprendan etileno ya que es sensible a concentraciones inferiores a 0.1 ppm (Lipton, 1987).

Después de la cosecha se producen cambios en la pigmentación, degradación de pectina, incremento del contenido de lignina, cambios en los ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, lípidos que influyen en su calidad final, aunque el color verde de la inflorescencia debido a la síntesis de los pigmentos clorofílicos no se inhiben (Fernández- León, 2012).

Los niveles de glucosinolatos y compuestos fenólicos disminuyen repercutiendo en su calidad funcional (Dixon, 2001; Jones et al., 2006).

Una mejora para extender su vida útil tanto a nivel visual como nutricional se puede lograr mediante el uso de técnicas como: atmósfera modificada, ultrasonidos, irradiación, 1-metilciclopropeno (1- MCP), o mediante el control de humedad relativa (alta) y la recirculación del aire durante el almacenamiento (Costa, 2006).

1.3 Productos de IV GAMA en base a brócoli

Los productos de IV gama, son hortalizas frescas, que han sufrido un tratamiento de preparación (Figura 2) y están listas para ser consumidas. El propósito de los alimentos mínimamente procesados es proporcionar al consumidor un producto muy parecido al fresco pero con una vida útil prolongada, garantizando la inocuidad y manteniendo una calidad nutritiva y sensorial (Carreras, 2006).

El brócoli es un producto perecedero, con una capacidad de almacenamiento máxima de tres días a 20°C. Para alargar la vida útil del brócoli se puede hacer mediante la elaboración de un producto de IV gama y el uso de atmósferas que contengan 1-2% O₂ con 5-10% CO₂ en un intervalo de temperatura de 0-5°C. Las fluctuaciones de temperatura durante el manejo comercial hacen que estas concentraciones no sean las idóneas y pueden llegar a provocar el desarrollo de compuestos volátiles azufrados de olor desagradable. La mayoría de los envases con atmósfera modificada para brócoli están diseñados para mantener concentraciones de 3-10% para O₂ y de 5-10% para CO₂ (Cantwell- Suslow, 2005).



Figura 2 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de vegetales de IV gama.
Fuente: (Santana et al., 2013)

1.4 Métodos de desinfección en los productos de IV gama

Como estos productos deben ser seguros sanitariamente, para ello es necesario emplear agentes desinfectantes en la etapa de lavado. Para, reducir la carga microbiana y la presencia de productos fitosanitarios. También es importante para eliminar los fluidos que liberan frutas y hortalizas al ser cortadas.

El tratamiento mayormente empleado para tal fin es la cloración:

1.4.1 Tratamiento con cloro

Desde hace décadas, el cloro y sus hipocloritos de sodio (NaClO) o calcio se han usado como principal agente desinfectante por razones de eficacia y economía.

La agencia catalana de seguridad alimentaria (ACSA, 2018), publica los parámetros que se aplican para desinfectar con hipoclorito de sodio, y detalla *“que el objetivo principal de utilizar agentes desinfectantes en el agua de lavado es evitar la contaminación cruzada entre diferentes lotes de hortalizas. Las dosis de cloro libre variarán según la concentración de materia orgánica en el agua del proceso, aunque se recomienda una concentración residual de cloro libre entre 10-20 ppm”*.

Los productos a base de cloro, como el hipoclorito sódico, son los desinfectantes más utilizados en la industria de la IV Gama por su eficacia, coste económico y uso sencillo. Tienen un amplio espectro de actividad, ya que pueden destruir hongos, mohos, bacterias y virus. Su eficacia contra los microorganismos depende del pH, temperatura, concentración, materia orgánica presente en el agua de lavado y el producto vegetal, el tiempo de exposición y la carga microbiana inicial.

Los compuestos de cloro generalmente se utilizan en concentraciones de 50-200 ppm de cloro libre y con tiempos de contacto inferiores a 5 minutos. Aunque el cloro es más eficaz en solución a niveles de pH ácidos, se utiliza a valores de pH entre 6,0 a 7,5 para minimizar la corrosión de los equipos de procesamiento (Allende et al., 2004).

El agua clorada se ha aplicado tradicionalmente para descontaminar, pero varios estudios han cuestionado su eficacia. Con el cloro, es difícil destruir los microorganismos en los pliegues y aberturas naturales de vegetales como la col, debido a su escasa difusión. Otros inconvenientes son su poder corrosivo a un pH bajo, su potencial para formar gas cloro tóxico, irritable por los operadores, y la formación de compuestos potencialmente tóxicos, como los trihalometanos, al unirse con la materia orgánica del agua de lavado (Gil et al., 2009)

Otros sistema de desinfección con cloro sería el cloro en forma de gas que es el Dióxido de cloro (ClO_2), es un gas soluble en agua, producido sintéticamente, tiene una alta eficacia biocida debido a la alta capacidad de oxidación, no forma compuestos peligrosos al entrar en contacto con la materia orgánica resultando un tratamiento menos agresivo.

1.4.2 Tratamientos alternativos

Aunque la cloración es el tratamiento utilizado mayoritariamente, algunos estudios indican que no siempre destruyen la microflora y, además, organizaciones de la salud y del medio ambiente han expresado su preocupación por su empleo debido a la formación de residuos químicos en el agua de proceso que recaen en el medio ambiente, o por generar compuestos perjudiciales para la salud como trihalometanos (THM) y cloraminas, considerados tóxicos para el hígado y el riñón (Graham, 1998). Por todo ello, surge el interés por otras técnicas sostenibles y emergentes de desinfección que puedan reemplazar al cloro, proporcionando otros beneficios, como sucede con el ozono (O_3), el agua electrolizada, las radiaciones ionizantes, los antimicrobianos naturales, las bacteriocinas, los tratamientos térmicos, ciertos agentes químicos como el ácido peroxiacético, ultrasonidos (Allende et al., 2004)

1.4.2.1 Tratamientos químicos

Son sustancias químicas que matan o desactivan microorganismos patógenos. Implican la aplicación de lavado mecánico en presencia de los desinfectantes, seguido generalmente de un aclarado con agua potable (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos químicos aplicados en la desinfección de vegetales

TRATAMIENTOS QUÍMICOS			
Técnica	Descripción	Ventajas	Inconvenientes
Ozono (O_3)	-Un generador toma aire del ambiente que pasa a través de un filtro y convierte el oxígeno (O_2) en ozono (O_3).	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere de una fuente de oxígeno que no sea el aire - Alta actividad antimicrobiana - Se descompone en productos no tóxicos - Más efectivo que el cloro en ciertos microorganismos 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto coste de inversión inicial - Daños la textura vegetal - Causa peroxidación lipídica - Requiere la generación in situ - Corrosivo - Alta inestabilidad (Reacciona con la materia orgánica)
Ácido peroxiacético o peracético	<ul style="list-style-type: none"> -Es una mezcla en el equilibrio de ácido acético y peróxido de hidrógeno. -Tiene un pH bajo (2.8). No tiene efectos tóxicos, se descompone en ácido acético, agua y oxígeno. 	<ul style="list-style-type: none"> - Eficaz en la destrucción de los patógenos a concentraciones más bajas que las requeridas para el cloro. No le afecta la carga orgánica del agua ni los cambios de temperatura - Actividad bactericida en un amplio intervalo de pH - Se adiciona en agua de lavado y limpieza de las superficies. 	<ul style="list-style-type: none"> - Eficacia variable frente a levaduras y mohos - Corrosivo para algunos materiales especialmente a alta temperatura - Agente oxidante y puede ser peligroso para manejar altas concentraciones
Agua electrolizada	-Se genera por electrólisis de una solución de cloruro de sodio, para producir una solución acuosa básica electrolizada en el cátodo y una solución ácida electrolizada en el ánodo (agua electrolizada ácida). El agua electrolizada ácida (pH 2.1-4.5) tiene una fuerte actividad	<ul style="list-style-type: none"> - Producción in situ del desinfectante (No es necesario almacenar). - Bactericida contra agentes patógenos y microorganismos causantes del deterioro. - Su uso a pH neutro no afecta al pH, color o aspecto general de vegetales 	<ul style="list-style-type: none"> - Vida útil corta -Se necesita equipo generador

	bactericida contra los patógenos transmitidos por los alimentos		
Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	-Actividad bactericida y inhibidora debido a sus propiedades como oxidante y por su capacidad de generar especies citotóxicas oxidantes, como radicales hidroxilo.	<ul style="list-style-type: none"> - Destruye formas vegetativas y esporas - No causa problemas de residuos - Fácil uso - No altera las características sensoriales de vegetales 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja eficacia antimicrobiana - El efecto depende de la concentración y del pH. - El efecto esporicida depende de la temperatura - Largo tiempo de contacto - Fitotóxicos - Impacto negativo en la calidad - Requiere la eliminación residual después de procesar
Ácidos orgánicos (el ácido láctico, ácido cítrico y ácido ascórbico)	-Acción microbiana debida a la reducción de pH en el medio, la interrupción del transporte o permeabilidad de la membrana, la acumulación de aniones o una reducción del pH celular interno.	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil de utilizar. - Inócuo. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja eficacia antimicrobiana -Largo tiempo de contacto - Interfiere en la calidad sensorial.
Soluciones a base de calcio (CaCl ₂)	-El calcio ayuda a mantener la integridad de la pared celular vegetal mediante la interacción con pectina para formar pectatos de calcio.	<ul style="list-style-type: none"> - Ayuda a mantener la firmeza durante el almacenamiento - Eficaz en la reducción de la clorofila , la pérdida de proteínas y la inhibición de la senescencia - El producto aumenta significativamente el contenido de calcio 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja eficacia antimicrobiana -Largo tiempo de contacto

Fuente: (Allende et al., 2004; Ramos et al., 2013)

1.4.2.2 Tratamientos físicos

Son métodos en los que se utilizan para reducir la viabilidad de los microorganismos. Aumentando su vida útil y manteniendo las propiedades sensoriales y nutricionales.

Estos tratamientos también son conocidos como no térmicos ya que no originan un incremento sustancial de la temperatura del alimento y por lo tanto afectan mínimamente las características nutritivas y sensoriales de los alimentos (Herrero y Avila, 2006).

En la tabla 4, se muestran las descripciones, ventajas e inconvenientes de los tratamientos físicos.

Tabla 4. Tratamientos físicos aplicados en la desinfección de vegetales

Tratamientos físicos			
Técnica	Fundamento	Ventajas	Inconvenientes
Pulsos eléctricos	<ul style="list-style-type: none"> - Los pulsos eléctricos tienen efecto letal en microorganismos) - Induce cambios estructurales en el ADN microbiano 	<ul style="list-style-type: none"> - Inactivación de bacterias y hongos en la superficie de productos alimentarios 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicación limitada en frutas y hortalizas frescas - Baja penetrabilidad - Poca información en frutas y verduras
Ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> - Campos ultrasónicos que consisten en ondas de alta amplitud que forman burbujas de cavitación, que generan energía mecánica que tiene una acción de limpieza en las superficies 	<ul style="list-style-type: none"> - Ultrasonidos de potencia 20-100KHz que tienen una aplicación potencial en la descontaminación de productos frescos. - Técnica no destructiva rápida y fiable 	<ul style="list-style-type: none"> - Puede haber efecto negativo en la calidad de alimentos - Puede tener eficacia reducida en levaduras y mohos
Radiación ultravioleta (UV)	<ul style="list-style-type: none"> - La radiación UV destruye los microorganismos, alterando directamente el ADN - Induce mecanismos de resistencia en los vegetales contra los patógenos - Tipos de radiación no ionizante con longitud de onda de 100-400nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo coste - Fácil de utilizar - Letal para la mayoría de microorganismos - No deja residuos - Puede inducir a la síntesis de compuestos bioactivos (antocianos, estilbenoideos) 	<ul style="list-style-type: none"> - Altas radiaciones de UV pueden causar daños en el tejido y aumentar la tasa de respiración - La turbidez o los sólidos suspendidos pueden interferir en la eficacia de la desinfección del agua

Irradiación gamma	<ul style="list-style-type: none"> -Bajas dosis de radiación gamma reduce bacterias, parásitos y protozoos patógenos en vegetales frescos. - Se utiliza un máximo de 1.0kGy en frutas y verduras. 	<ul style="list-style-type: none"> -Poco deterioramiento nutricional - No altera las propiedades sensoriales 	<ul style="list-style-type: none"> - Pérdida de atributos de calidad. - Preocupación del consumidor para el consumo a largo plazo de los productos irradiados
Plasma Frio	<ul style="list-style-type: none"> -Utiliza electricidad y un gas portador (aire, oxígeno, nitrógeno, argón, helio). -Inactivación de microorganismos que se localizan en la superficie. 	<ul style="list-style-type: none"> -Inactivación microbiana por todas las partes del producto, porque fluye por toda la superficie, incluidas las de efecto sombra. -Mantiene los parámetros de calidad del alimento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja penetrabilidad. -Descontaminación leve de la superficie en los vegetales.
Altas presiones hidrostáticas	<ul style="list-style-type: none"> -Pueden inactivar enzimas y microorganismos. Se utiliza presiones de 3.000-8.000 bares 	<ul style="list-style-type: none"> -Poca alteración nutricional -Alta calidad organoléptica 	<ul style="list-style-type: none"> -Afecta a la textura, sobre los tejidos vegetales

Fuente: (Allende et al., 2004; Ramos et al., 2013)

1.5 Los ultrasonidos

Los ultrasonidos (US) es una tecnología utilizada en la industria alimentaria para inactivación enzimática y microbiana y para la mejora de las operaciones de procesos. Permiten conservar la calidad nutricional, sensorial y la biodisponibilidad de los compuestos beneficiosos que contienen los alimentos.

Ultrasonido es el nombre que reciben las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano. Las ondas abarcan frecuencias entre 16KHz y 20MHz, las cuales al ser aplicadas pueden llegar hasta 5MHz en gases o hasta 500MHz en líquidos y sólidos (Arroyo et al., 2011). Se utiliza en control de calidad para la evaluación de textura, composición y viscosidad de alimentos (Brown et al., 2005), para el desarrollo de técnicas de análisis no invasivas y para determinar el nivel de homogenización de glóbulos de grasa en leche (Bosiljkov et al., 2009).

Los ultrasonidos se considera una tecnología idónea para la destrucción de microorganismos a temperaturas de procesamiento inferiores a las utilizadas durante la esterilización, y para acompañar otras tecnologías de proceso como lo son la extracción, las altas presiones, la pasteurización (Demirdöven et al., 2009).

Villamiel y de Jong, (2000) Reportaron que el resultante de la variación del tamaño de la burbuja y posterior colapso, es el desarrollo de fuertes corrientes de micro-transmisión asociadas a gradientes de alta velocidad y esfuerzos cortantes que alteran las características de los medios, parte de las ondas pueden absorberse en forma de calor, las temperaturas alcanzadas suelen ser inferior a 70 °C.

El mecanismo de inactivación enzimática por ultrasonido está asociado con la cavitación que consiste en generar radicales libres altamente reactivos ($H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$), por la disociación de vapor atrapado en las burbujas de cavitación, como se puede ver en la figura 3, Otro efecto de la cavitación es la formación de turbulencia local y micro-circulación del líquido en el reactor o recipiente contenedor, lo cual favorece los mecanismos de transporte, principalmente disminuye la resistencia a la transferencia de masa en sistemas heterogéneos (Gogate & Kabadi, 2009).

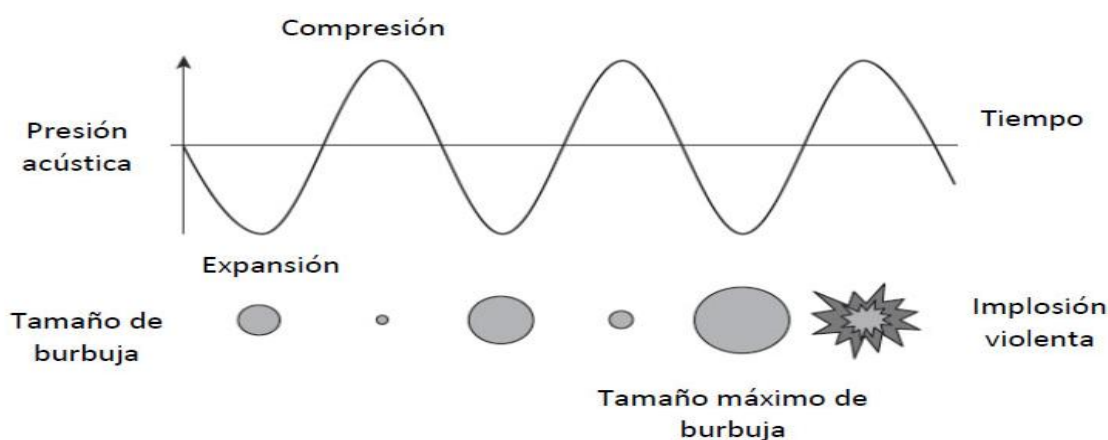


Figura 3. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad
Fuente: Adaptado de (Alava et al., 2007)

Los US inducen el rompimiento de puentes de hidrógeno y la interrupción de las interacciones de van der Waals en las cadenas del polipéptido, dando lugar a alteraciones de las estructuras secundarias y terciarias de la proteína. Las actividades biológicas de las enzimas se pierden por estas modificaciones causando la muerte celular, esto conlleva a la formación de radicales libres y el aumento de la temperatura y la presión (Mawson, Gamage, Terefe, y Knoerzer, 2010).

En la tabla 5, se puede encontrar un resumen de lo comentado.

Tabla 5. Mecanismos de inactivación de los ultrasonidos

TEORIA	MECANISMO	APLICACIONES	REFERENCIA
Cavitación	<ul style="list-style-type: none"> -Eliminación mecánica de bacterias adheridas o atrapadas. -Localizadas a altas temperaturas (5500 °C) y presiones (500 MPa). -Aumento de la permeabilidad de las membranas o pérdida de selectividad. -Interrupción (estrés y calentamiento localizado) y reacciones químicas en la célula del microorganismo. 	<ul style="list-style-type: none"> -Procesos de desinfección -Inactivación enzimática -lisis celular y bactericida. 	<p>Seymour et al. 2002</p> <p>Mason and Luche 1996; Vercet et al. 2001.</p> <p>Lehmann and Krusen 1954.</p> <p>Piyasena et al. 2003.</p>
Formación de radicales libres	-Sonólisis (descomposición por ondas sonoras) del agua que puede producir iones (OH^- y H^+) y peróxido de hidrogeno.	<ul style="list-style-type: none"> -Inactivación microbiana -Actividad enzimática. 	Suslick 1988; Vercet et al. 1997; O'Donnell et al. 2010
Choques mecánicos intracelulares	-Ruptura de las células y disminución del grueso de las paredes celulares.	<ul style="list-style-type: none"> -Lisis celular -Inactivación enzimática -Efecto antimicrobiano. 	Butz and Tauscher 2002; Fellows 2000; O'Brien 2007.
Generación de energía mecánica	-Propagación de la onda, decrece con la distancia al ser aplicado en un material. La parte que es absorbida se traduce en calor.	-Inactivación microbiana.	Scherba et al. 1991; Sala et al. 1995; O'Brien 2007
Fuerza de radiación	-Movimiento o vibración local de un tejido por fuerza de radiación acústica.	-Análisis clínicos.	Delgado 2011
Comprensión y rarefacción o ciclos de compresión/ expansión	-Micro-corriente acústica.	-Inactivación microbiana.	Floros y Liang 1994; O'Donnell et al. 2010

Fuente: (Ahmed et al., 2010)

1.6 Aplicación y efecto de los ultrasonidos en frutas y hortalizas

El objetivo de la aplicación de ultrasonidos en frutas y hortalizas, es extender la vida útil a través de la inhibición de reacciones enzimáticas, reducir el crecimiento microbiano y la conservación de aspectos nutricionales y sensoriales.

Para ello se inactivan enzimas involucrados en el gusto y olor, como: Lipoxigenasa, lipasas y proteasas. En la textura las pectinasas, b-glucosidasas, celulasas, hemicelulasas y peroxidadas; en el color las antocianinas, peroxidadas, lipoxigenasas, clorofilasas y polifenoloxidasas (Zheng y Sun, 2006).

Los ultrasonidos alteran la estructura de la pared celular y las propiedades mecánicas rompiendo las células vegetales, penetrando la membrana y ocasionando la difusión del contenido interno a través de la membrana y pared celular y causando la disminución gradual de la presión de turgencia (Day et al., 2012).

El aumento de temperatura durante un tratamiento térmico para procesado frutas y vegetales, generan cambios de estructura y alteraciones fisiológicas sobre el tejido vegetal ocasionando pérdida de presión de turgencia y ablandamiento. Las temperaturas utilizadas en los US son más bajas, lo que ocasiona que se reduzca la tasa de respiración de los vegetales y minimiza la pérdida de textura (Freitas et., 2014). En la Tabla 6, se muestra un resumen de los efectos de los ultrasonidos.

Tabla 6. Efecto de los ultrasonidos en frutas y hortalizas

ALIMENTO	PARÁMETROS evaluados	CONDICIONES	OBSERVACIONES
Lechuga	Color, ácido ascórbico	40 kHz, 5 -10min	Incremento del color verde. Degradación del ácido ascórbico.
Fresa	Ácido ascórbico, inactivación enzimática.	20 kHz, t: 10-25 min. Tº: 20°C	Degradación del ácido ascórbico. Inactivación 90% de enzimas.
Pimiento rojo	Color, ácido ascórbico	35 kHz, 15°C	Modificaciones del color. Degradación del ácido ascórbico.
Zanahoria	Color, Betacarotenos, Inactivación microbiana	45 kHz, 5 min	Oscurecimiento y ablandamiento. Reducción microbiana
Patata	Almidón, inactivación enzimática	20 kHz, t: 10-25 min. Tº: 20°C	Oscurecimiento. Aumenta extracción almidón. Inactivación 90% de enzimas.
Tomate	Color, ácido ascórbico	20 kHz; t: 2–10 min ; T:32–45°C	Modificaciones del color . Degradación del ácido ascórbico.
Berros	Vitamina C, inactivación microbiana	20 kHz t: 0–120 min T: 65°C	Reducción microbiana. Pérdida de vitamina C.
Piña	pH, color, antocianos	24 kHz t: 0,5–10 min T:40–60°C	Oscurecimiento. Modificación del pH. Detección de malos sabores.
		20 kHz t: 8 min T:43–58°C	Disminución de antocianos.
Naranja	Color, ácido ascórbico	20 kHz t:2–10 min T:10 °C	Oscurecimiento. Degradación del ácido ascórbico.
Boniato	Carotenoides, microbiológicos	20 kHz t: 0–60 min T:30 °C	Ablandamiento. Cambio de color. Reducción microbiana
Manzana	pH, color, antocianos	24 kHz t: 0,5–10 min T:40–60 °C	Oscurecimiento. Modificación del pH.
		20 kHz t: 8 min T:43–58 °C	Sabores desagradables. Pérdida de antocianos.
Uva	pH, color, antocianos	24 kHz t: 0,5–10 min T:40–60 °C	Oscurecimiento y modificación del pH, Cambios desagradables del flavour
		20 kHz t: 8 min T:43–58°C	y pérdida de antocianos.

Fuente: (Pingret et al., 2013); (Hurtado Díaz, 2013); (Caballero Anento, 2017); (Lifen Zhang, 2018); (Ginés Rodríguez, 2015).

Como se puede ver en la tabla 6, la frecuencia más utilizada mayoritariamente es la de 20 kHz y 40 kHz, los tiempos de aplicación oscilan entre 5 y 10 min, a excepción en el boniato y la patata que los tiempos son superiores.

En general a menor frecuencia utilizada, tiempos de aplicación más prolongados. Mayor frecuencia, tiempos cortos.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo final de grado es evaluar la viabilidad del uso de ultrasonidos en brócoli (*Brassica oleracea* L.var. *italica*) como operación preliminar y estudiar su efecto en su calidad nutricional.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar el efecto del tiempo de aplicación (3, 6 y 10 minutos) de los ultrasonidos en el contenido de compuestos bioactivos.
- Comparar el tratamiento de ultrasonidos versus el escaldado en la retención de compuestos bioactivos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

El brócoli (*Brassica oleracea* L.) de variedad *italica* que se utilizó durante este estudio, procede de Murcia, se ha obtenido a través de la cadena de fruterías: Casa Ametller. Para el estudio se procesaron 5kg de brócoli, formado por 15 pellas, cada una de ellas de un peso aproximado entre 300 a 400g (Figura 4). Desde la compra hasta los análisis las muestras se mantuvieron refrigeradas ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).



Figura 4. Muestras de brócoli
Fuente: Propia

3.2 Equipo de ultrasonidos

Para la aplicación de ultrasonidos se utilizó: Baño modelo 2510 (Branson) con frecuencia de 40 kHz y capacidad de 2 litros y potencia de 130W. (Figura 5 y 6)



Figura 6. Equipo de (US) utilizados.
Branson 40 kHz
Fuente: Propia



Figura 5. Muestras de brócoli,
durante la aplicación de US
Fuente: Propia

3.3 Equipos de medida de temperatura y pH

Para medir la temperatura se utilizó la sonda HANNA- Checktemp 1.

Para la medida del pH se utilizó el pHmetro, Crison modelo GLP 21, con Electrodo de pH, Crison modelo 52-02 y un agitador termomagnético, Velp Scientifica.

3.4 Diseño experimental

En este estudio se han realizado tres experimentos, de cada experimento se ha hecho tres repeticiones, y los análisis se han hecho por triplicado ($n=9$).

La preparación de la muestra ha consistido en obtener las flores por separado manteniendo unos 2 cm de pedúnculo, realizando una posterior mezcla para lograr una mayor homogeneidad. Como se observa en la figura 7.



Figura 7. Mezcla de flores de brócoli con 2cm de pedúnculo
Fuente: Propia

Una vez separadas se mezclan para obtener una muestra representativa y se procedía a realizar el pre-tratamiento: Escaldado o ultrasonidos utilizando una proporción muestra/agua (1:10). Después se escurría la muestra y se procedía a la extracción para realización de los diferentes análisis. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

El diseño experimental de este estudio se puede ver en la figura 8.

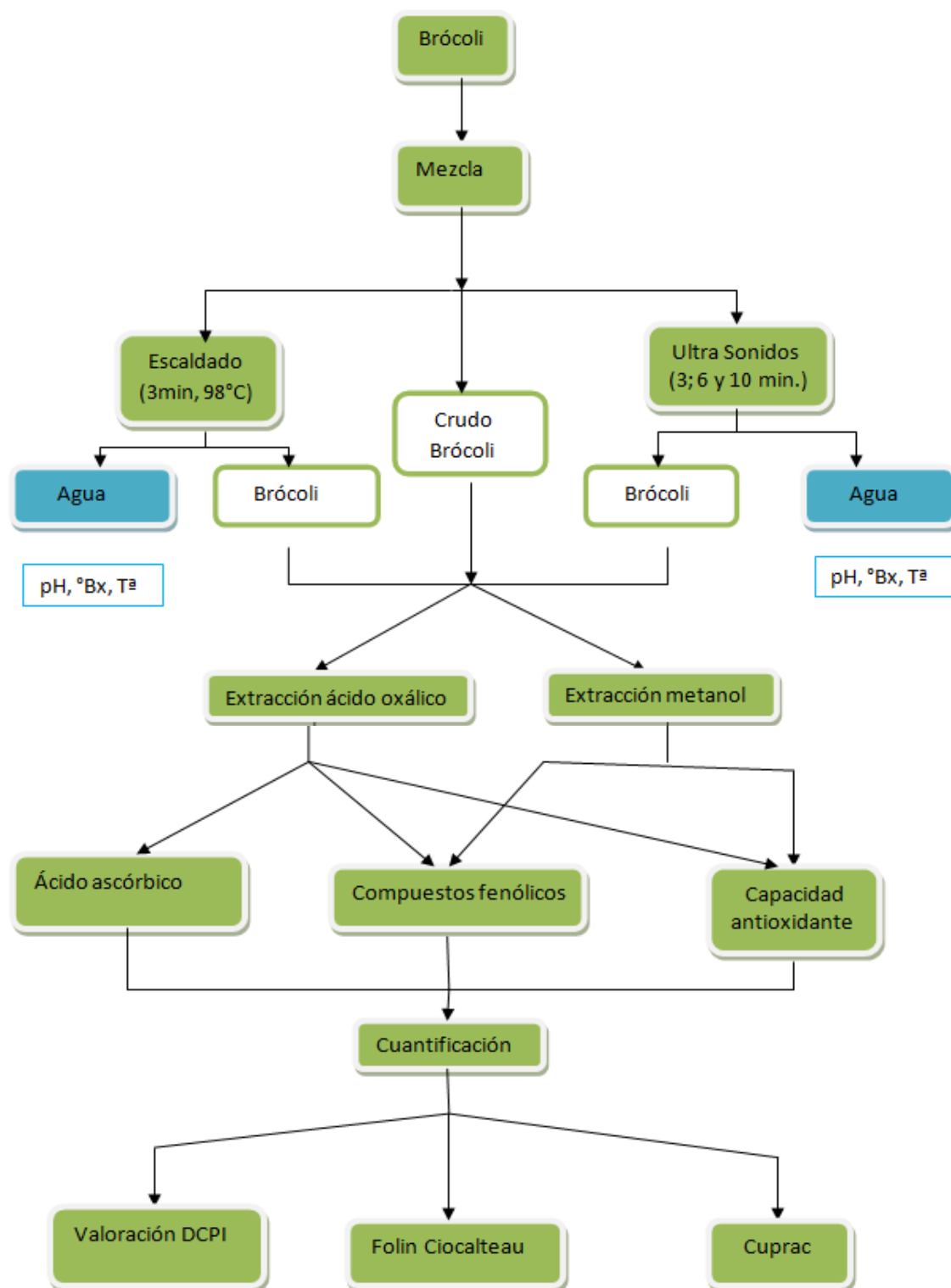


Figura 8. Diseño experimental

3.5 Métodos analíticos

Extracción con ÁCIDO OXÁLICO 1% (w/v)

Se extrajo la muestra con ácido oxálico para determinación de:

- *Contenido de ácido ascórbico.
- *Compuestos fenólicos.
- *Capacidad antioxidante.

Para realizar esta extracción se utilizaron 25 g de muestra que se trituraron con 70 mL de ácido oxálico 1%(w/v). Posteriormente se filtra en matraz aforado y se enrasa a 100 mL con ácido oxálico. Posteriormente se realiza una dilución 1/10 con ácido oxálico 1% (w/v) para hacer las cuantificaciones correspondientes.

Extracción con METANOL 80% (v/v)

Se hizo la extracción con metanol para la determinación de:

- *Compuestos fenólicos.
- *Capacidad antioxidante.

Solución 80% metanol 0.02% HCl (800 mL metanol + 0.458 mL HCl enrasado a 1L)

Para realizar la extracción se pesaron 20g de muestra fresca, se añadió 100 mL de solución 80% metanol 0.02% HCl y se trituró. Luego en un vaso de precipitados se sonicó 14 minutos (Bandeline Sonoplus GM70, Alemania). Posteriormente, la muestra se centrifugó (Selecta, Medifriger-BL, España) a 9500 rpm y 4°C durante 10 minutos y finalmente se filtró y enrasó a 100 mL. Como se observa en la figura 9.



Figura 9. Muestras de brócoli después de la filtración
Fuente: Propia

3.5.1 Determinación del contenido de ácido ascórbico (vitamina C)

En este estudio el ácido ascórbico fue cuantificado por el método Tillmans. Keller 1988. AOAC 967.21 (2000), que se trata de un método de valoración oxido-reducción en el que se usa el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI), que es de color azul en condiciones alcalinas, rosa en condiciones ácidas e incoloro cuando es reducido por el ácido ascórbico, siguiendo la siguiente reacción:

Ác. Ascórbico + DCPI oxidado (rojo) → ác. Dehidroascórbico + DCPI reducido (incoloro)

Procedimiento: Se pesaron 25g de muestra, se trituraron, con aproximadamente 70mL de ácido oxálico al 1%(w/v). Posteriormente se filtró el líquido en matraces aforados de 100mL y se enrasaron con la solución de ácido oxálico al 1% (w/v).

La estandarización del DCPI se realizó a partir de un patrón de ácido ascórbico de 1mg/mL. Se preparó el patrón, pesando 50 ± 0.1 mg de ácido ascórbico y disolviéndolo en 50 mL de ácido oxálico al 1% (w/v). Seguidamente, se pipetearon 5 mL y se disolvieron en 50mL de ácido oxálico. Obteniendo un patrón de 0.1mg/mL. De este extracto se pipetearon 2mL de la solución patrón en un Erlenmeyer y se añadieron 5mL del ácido oxálico, valorándolo con el DCPI, por duplicado. La valoración final se da cuando la primera gota en exceso de DCPI da lugar a una coloración rosada de la solución.

*Estandarización del DCPI: X mL DCPI

$$\frac{50 \text{ mg } \acute{a}c. Asc.}{50 \text{ mL sol. 1}} \cdot \frac{5 \text{ mL sol. 1}}{50 \text{ mL sol. 2}} \cdot \frac{2 \text{ mL sol. 2}}{X \text{ mL DCPI}} = X \text{ mg } \acute{a}c. Asc. / \text{mL DCPI}$$

*Muestra: X= mL DCPI

$$\frac{X \text{ mL DCPI}}{5 \text{ mL sol. 1}} \cdot \frac{50 \text{ mL sol. 1}}{5 \text{ mL sol. 2}} \cdot \frac{100 \text{ mL sol. 2}}{25 \text{ g de muestra}} = \frac{X \text{ mL DCPI}}{\text{g muestra fresca}}$$

$$\frac{X \text{ mL DCPI}}{\text{g muestra fresca}} \cdot \frac{X \text{ mg } \acute{a}c. Asc.}{1 \text{ mL DCPI}} = \frac{X \text{ mg } \acute{a}c. Asc.}{100 \text{ g muestra fresca}}$$

3.5.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos se utilizó el método de determinación por colorimetría Folin-Ciocalteu.

Método FOLIN CIOCALTEAU

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Sin embargo este reactivo no solo mide los fenoles totales sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora, por lo que mide la capacidad reductora total de una muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul, que es el que medimos a una longitud de onda de 760 nm. (Figura 10)

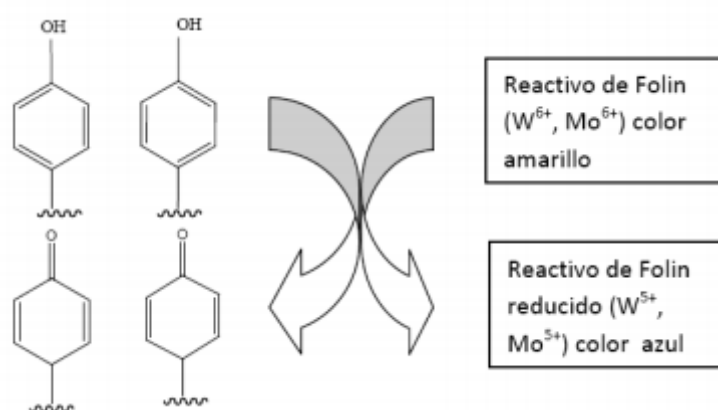


Figura 10. Reacción de Folin-Ciocalteu
Fuente: (Girbés y Jiménez, 2010)

Para hacer la recta patrón se partió de una solución de ácido Gálico de 5g/L, y a partir de diferentes diluciones se obtuvieron los patrones de 50, 100, 250, 500 mg/ L.

En una cubeta de 2mL, se añadió 20 µL de la muestra, de agua destilada (blanco) o de los patrones. Se añadió 1.58 mL de agua y 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Se incubó durante 8 minutos. Después se añadieron 300 µL de solución de carbonato de sodio al 20%, se mezcló y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

Finalmente se midió la absorbancia de las muestras (Espectrofotómetro Nicolet Evolution 300 Thermo Electron Corporation) a una $\lambda = 765$ nm. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente en 100 gramos de muestra fresca (mg AGE / 100g MF). En la (Figura 11) se muestra la recta de calibración.

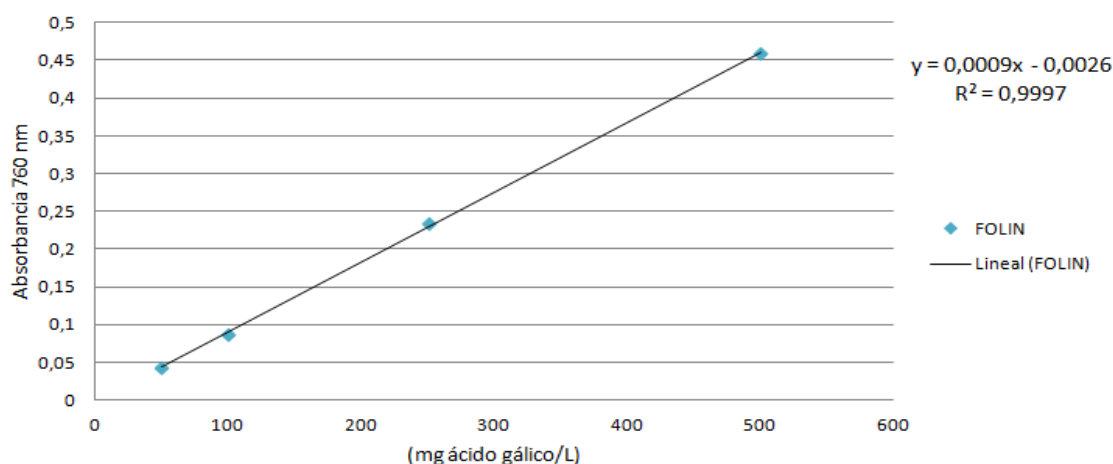


Figura 11. Determinación de fenoles totales. Recta de calibración. En el eje de abscisas se expresa la concentración de ácido gálico y en el eje de ordenadas, la absorbancia a 760 nm.

3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante:

Para la determinación de la capacidad antioxidante se hizo por medio del método de Cuprac.

Método CUPRAC

El método CUPRAC consiste en medir la capacidad antioxidante reductora de los antioxidantes de la muestra. Se utiliza la Neocuproína y se basa en una reducción cúprica de Cu (II) a Cu (I) por la acción como agente oxidante cromogénico. El máximo de absorción está a 450 nm (Figura 12).

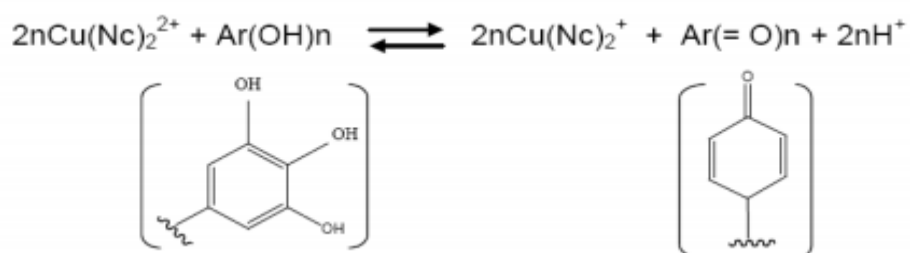


Figura 12. Reacción del método de CUPRAC.
Fuente: (Girbés y Jiménez, 2010).

Para la preparación del patrón 1mM de Trolox en etanol, se pesó 0.243g de Trolox en 100mL de etanol al 96%. A partir del cual se obtuvieron concentraciones para hacer la recta de calibración (25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- CuCl_2 solución $1.0 \cdot 10^{-2}$ M Cu (II): Se preparó disolviendo 0.4262g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua, y diluyendo a 250 mL.
- Acetato de amonio tampón a pH 7, 1M: Se preparó disolviendo 19.27g acetato amónico en agua y diluyendo hasta 250 mL.
- Neocuproína solución (Nc), $7.5 \cdot 10^{-3}$ M: Se preparó diariamente disolviendo 0.039g Nc en etanol al 96%, y diluyendo a 25 mL con etanol.
- Trolox, $1.0 \cdot 10^{-3}$ M: Se preparó en 96% de etanol.

Procedimiento: En una cubeta de 5 mL se añadió 1 mL de Cu(II), 1 mL de Nc, 1 mL de acetato de amonio y 1.1 mL de muestra, patrones o agua destilada (blanco) con el fin de que el volumen final sea 4.1 mL. Después de 1 h, se mide la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se interpolan en la recta de calibrado de 1mM de Trolox y se expresan en μg equivalentes de Trolox por kilogramo de peso fresco (figura 13).

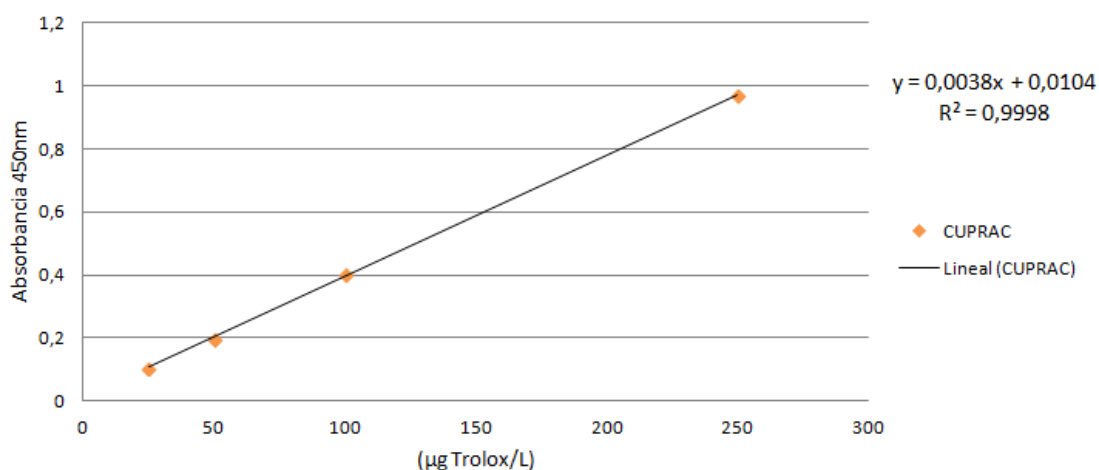


Figura 13. Determinación de la capacidad antioxidante. Recta de calibración.

En el eje de abscisas se expresan la concentración de Trolox y en el eje de ordenadas, la absorbancia a 450 nm

3.6 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos, se utilizó el programa Microsoft Excel 2010, el programa estadístico informático SPSS versión 15, mediante el que se realizaron los siguientes análisis:

Análisis de varianza (ANOVA) de un factor y dos factores a los datos obtenidos con un nivel de significancia de 0.05, comprobando el cumplimiento de los supuestos de normalidad con Shapiro-Wilk. Se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para probar la diferencia de las medias de los tratamientos. El análisis de correlación entre variables (compuestos fenólicos y actividad antioxidante) fue evaluado mediante una prueba de correlación de Pearson empleando un nivel de significancia de 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evolución de la temperatura interior del brócoli durante el tratamiento

Las muestras de brócoli fueron sometidas a los tratamientos de escaldado durante 3 minutos, o de ultrasonidos a una frecuencia de 40 KHz durante 3, 6 y 10 minutos. En la figura 14 se presenta la evolución de la temperatura dependiendo del tratamiento. Cada resultado es el análisis de tres experimentos y tres réplicas por experimento.

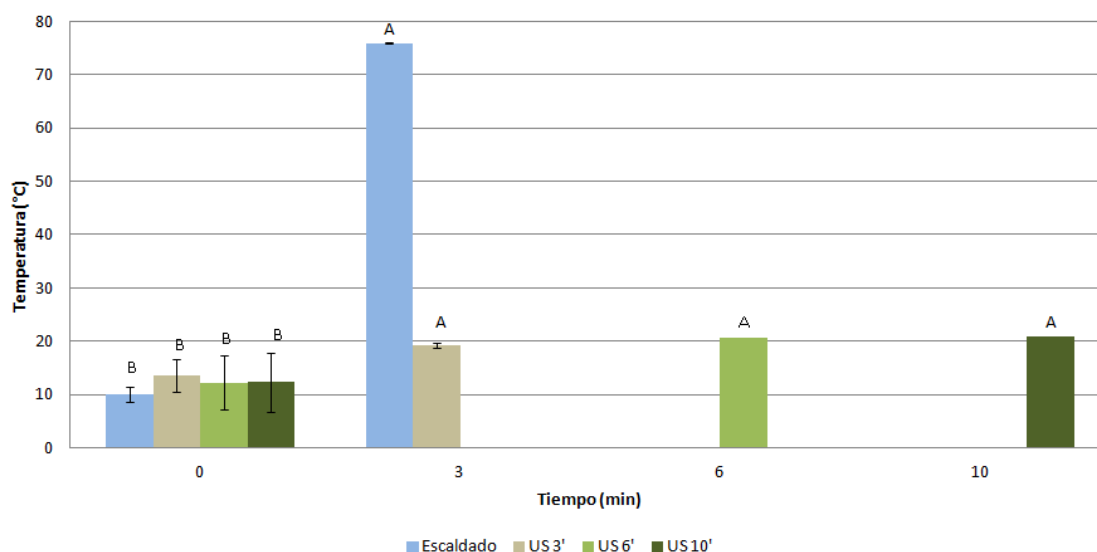


Figura 14. Variación de la temperatura interior del brócoli (°C) durante la aplicación de los diferentes métodos

Todos los valores son expresados como media \pm DE de tres experimentos independientes ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas al principio y final de cada tratamiento ($p<0.05$).

Se observó que el método de escaldado alcanzó la temperatura interior más alta, como es evidente debido a que la temperatura del medio (el agua), alcanza los $96\pm 2^{\circ}\text{C}$. En las muestras tratadas con ultrasonidos, se observa que apenas ha habido variación de temperatura durante la aplicación en los diferentes tiempos. En todos los tratamientos realizados, hay diferencias significativas ($p<0.05$).

El incremento total de la temperatura interior del brócoli en las condiciones ensayadas para el tratamiento de ultrasonidos es de un máximo de 7.6°C .

Mason et al., (1996) citado en Brennam, (2008). Exponen que la cavitación es la que incrementa la temperatura, se origina cuando los ultrasonidos atraviesan un medio líquido formando micro burbujas, cuyo tamaño se incrementa hasta alcanzar un tamaño crítico, implosionando o colapsando violentamente para regresar a su tamaño normal. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, esto produce cambios físicos, químicos en el micro entorno de las células.

4.2 Variaciones de pH y temperatura del agua durante el tratamiento

Se observó que en el escaldado se incrementa el pH del agua. Por otra parte, en la aplicación de ultrasonidos, se produce una ligera disminución del pH al aumentar el tiempo de aplicación (Tabla 7).

Tabla 7. Variación del pH del agua de brócoli durante la aplicación de escaldado y ultrasonidos

TRATAMIENTO	pH inicial	pH final
Escaldado	5.92± 0.02 B	6.25± 0.09 A
US 3 min	5.69 ± 0.01B	5.50 ± 0.09 A
US 6 min	5.96± 0.06 B	5.66 ± 0.07 A
US 10 min	5.63± 0.12 B	5.44± 0.10 A

Todos los valores son expresados como media ± DE de tres experimentos independientes analizadas por triplicado (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas al principio y final de cada tratamiento ($p<0.05$).

La temperatura del agua durante la sonicación sufrió un ligero incremento de $\pm 1^{\circ}\text{C}$, pero siempre se ha mantenido alrededor de los 20°C independientemente del tiempo de aplicación de la sonicación (Tabla 8).

Tabla 8. Variación de la temperatura del agua de brócoli durante la aplicación de escaldado y ultrasonidos

TRATAMIENTO	Tª inicial (agua)	Tª final (agua)
Escaldado	89.06 ± 0.1b	98.43 ± 0.15a
US 3 min.	18.56 ± 0.06b	19.37± 0.40a
US 6 min.	19.03 ± 0.06b	20.90 ± 0.32a
US 10 min.	18.40 ± 0.17b	21.03 ± 0.15a

Todos los valores son expresados como media ± DE de tres experimentos independientes analizadas por triplicado (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas al principio y final de cada tratamiento ($p<0.05$).

4.3 Efecto del escaldado y los ultrasonidos en el contenido de ÁCIDO ASCÓRBICO

El contenido de ácido ascórbico antes y después de los tratamientos realizados en el brócoli se muestra en la figura 15.

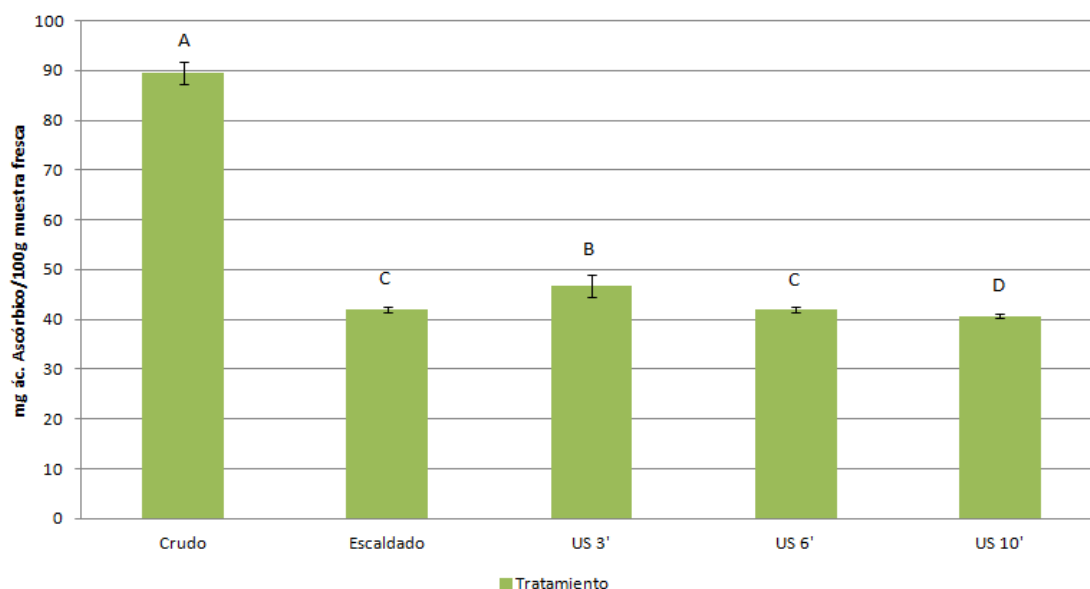


Figura 15. Efecto del tratamiento aplicado en el contenido de ácido ascórbico en el brócoli

Todos los valores son expresados como media \pm DE de tres experimentos independientes analizadas por triplicado ($n=9$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$).

En el brócoli crudo el contenido de ácido ascórbico fue de $89,6 \text{ mg de ácido ascórbico} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de muestra fresca (MF). Mientras que en el escaldado y en los tratamientos con ultrasonidos osciló entre los $42,1$ y los $47,5 \text{ mg de ácido ascórbico} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de MF. Estos resultados están acorde con los valores publicados en la base de datos USDA (2019) que son de $89,2$ y $40,1 \text{ mg de ácido ascórbico} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de MF para el brócoli crudo y escaldado respectivamente; produciéndose unas pérdidas de vitaminas cercanas al 50%.

Santos y Silva (2008) citados por Gamboa (2013) exponen que la pérdida de ácido ascórbico se atribuye al efecto del incremento de la temperatura, al efecto de la cavitación con la creación de radicales con carácter oxidativo en condiciones aerobias y al efecto de la solubilidad.

El contenido de ácido ascórbico en vegetales sometidos a un tratamiento de escaldado, se pierde en gran medida por lixiviación y oxidación a temperaturas elevadas, ya que es una vitamina muy sensible, se degrada con mayor facilidad durante el procesamiento y almacenamiento.

Los factores que influyentes en su degradación, son: El pH, la temperatura, el oxígeno, la actividad de agua y la presencia de enzimas o de catalizadores metálicos (Santos y Silva, 2008; Spínola et al., 2013).

Martin Gracia (2017) propone que los tratamientos térmicos en medio acuoso alteran a los antioxidantes polares como los polifenoles o el ácido ascórbico, afirma que el contenido de ácido ascórbico se reduce un 50% en la muestras tratadas en comparación sin tratamiento.

4.4 Efecto del escaldado o los ultrasonidos en el contenido de COMPUESTOS FENÓLICOS

Los valores de los compuestos fenólicos en brócoli crudo en este estudio según el método Folin-Ciocalteu fueron 100.1 mg AGE/100g de MF.

Si se comparan con los valores reportados por otros autores para el brócoli crudo se puede observar que (Ninfali et al., 2005), encontraron concentraciones, de 109.5 mg AGE/100g de MF, mientras en la base de datos Phenol-Explorer indica se obtienen concentraciones de 150.3 mg AGE /100g MF (Rothwell et al., 2013; Yamaguchi et al., 2003) ; en USDA (2019); los valores reportados son 198.5 mg GAE /100g de MF.

Por lo tanto, los valores obtenidos en este estudio estarían dentro de los bibliográficos aunque en la zona inferior.

Los resultados obtenidos de los tres experimentos se pueden observar en la figura 16.

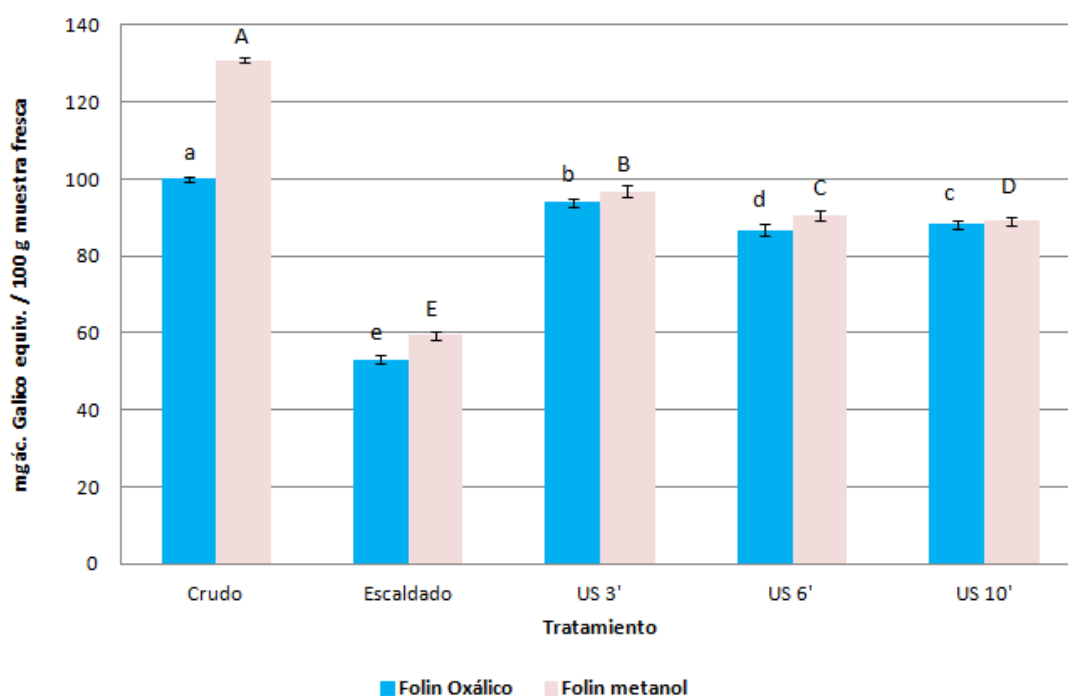


Figura 16. Compuestos fenólicos en el brócoli mediante método de Folin-Ciocalteu.

Media de cada tratamiento seguida de letra de significación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Extracción con ácido oxálico (a, b, c, d, e). Extracción con metanol (A, B, C, D, E). (n=9).

Como se puede observar en la figura 16, el efecto del tipo de extractante utilizado (ácido oxálico o metanol) influye en el contenido total determinado; en general la extracción con metanol da resultados superiores a la extracción con ácido oxálico, siendo especialmente notoria esta diferencia en el brócoli crudo.

Al igual que en el caso del ácido ascórbico al utilizar el extracto obtenido con ácido oxálico, la mayor concentración de compuestos fenólicos se obtuvo en el brócoli crudo, observándose menores pérdidas en el caso del uso de la sonicación. En el caso del escaldado la pérdida es de alrededor del 50%. Mientras que en los tratamientos con ultrasonidos, la pérdida aunque es significativa, es inferior al 20% ($p < 0.05$).

Resultados parecidos se obtienen al comparar utilizando los extractos obtenidos con metanol, pero con pérdidas de hasta el 60-65% en el caso de la muestra escaldada.

En la extracción con oxálico los resultados superiores se obtuvieron en el crudo $>US\ 3min > US\ 10min > US\ 6\ min > escaldado$ (a, b, c, d, e), en los resultados con metanol crudo $>US\ 3min > US\ 6min > US\ 10\ min > escaldado$ (A, B, C, D, E). En ambos métodos de extracción los resultados inferiores dieron las muestras escaldadas.

Cartea et al., (2011) mencionan que el contenido de compuestos fenólicos y la biodisponibilidad en el brócoli dependen del método de análisis utilizado y el tipo de extracción.

(Vallejo et al., 2003) citado en Cartea et al., (2011). Estudió sobre las pérdidas en compuestos fenólicos en el brócoli, que fue sometido a escaldado, vapor y microondas, encontraron desventajas cuando se utilizó la cocción por microondas y escaldado notando pérdidas importantes de los diferentes compuestos fenólicos. Resultados similares reportó Francisco et al., (2010) que informó de una pérdida de 65-75% de flavonoides y 70-80% de ácidos hidroxicinámicos, en métodos con incremento de temperatura. Sin embargo, las pérdidas se reducen a 20-30% al vapor de cocción, mostrando que este es el método ideal para preservar compuestos fenólicos en Brócoli.

Zhang y Hamazu, (2004) reportaron que en las muestras sometidas a tratamientos que implican aumento de temperatura y sumergidas en medio acuoso, las pérdidas en los fenoles totales se debe a la característica hidrosoluble de los compuestos fenólicos.

Otra interpretación que se puede dar a los resultados, es la estudiada por Ramešová et al., (2011), citado por Martín García, (2017); en donde afirma que la quercetina es un compuesto bioactivo que tiene alta inestabilidad en presencia del oxígeno atmosférico, y es el principal flavonoide en el brócoli. En nuestro estudio durante la aplicación de los tratamientos de ultrasonidos y escaldado las muestras de brócoli estuvieron más expuestas al oxígeno atmosférico, lo cual se interpreta como una de las causas de las pérdidas de compuestos fenólicos en comparación con el brócoli crudo.

4.5 Efecto del escaldado o los ultrasonidos en la CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CUPRAC)

Los resultados obtenidos de los análisis de la capacidad antioxidante, como se puede observar en la figura 17 la extracción con metanol comporta la obtención de resultados superiores a la extracción con oxálico. El escaldado continua siendo el tratamiento con valores significativamente inferiores, no observándose diferencias significativas entre las muestras sonicadas 6 y 10 min.

En el brócoli crudo la capacidad antioxidante obtenida con el extracto en metanol es un 23 % superior a la del extracto con oxálico, pero esta diferencia se ve acentuada al realizar los pre-tratamientos de escaldado y sonicación, ya que entonces la diferencia se encuentra alrededor del 45% (entre 44-47%). Independientemente del pretratamiento realizado y del tiempo de sonicación utilizado. Aunque el resultado obtenido con el extracto realizado con metanol es siempre superior, la tendencia es similar a los obtenidos con extracto de ácido oxálico. (Crudo > US 3min > US 6min = US 10 min > escaldado).

Se hace la correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante para cada tipo de extracción. Para la extracción con oxálico se obtuvo una correlación positiva con un coeficiente de correlación de $r > 0.6$.

En la comparación en la extracción de metanol se obtuvo un alto coeficiente de correlación de $r \geq 0.85$. Estos resultados son similares a los encontrados por Kähkönen et al.; (1999) y Serrano et al., (2006) que afirmaron que los compuestos fenólicos son los principales contribuyentes a la mayor capacidad antioxidante en brócoli ($r > 0.93$)

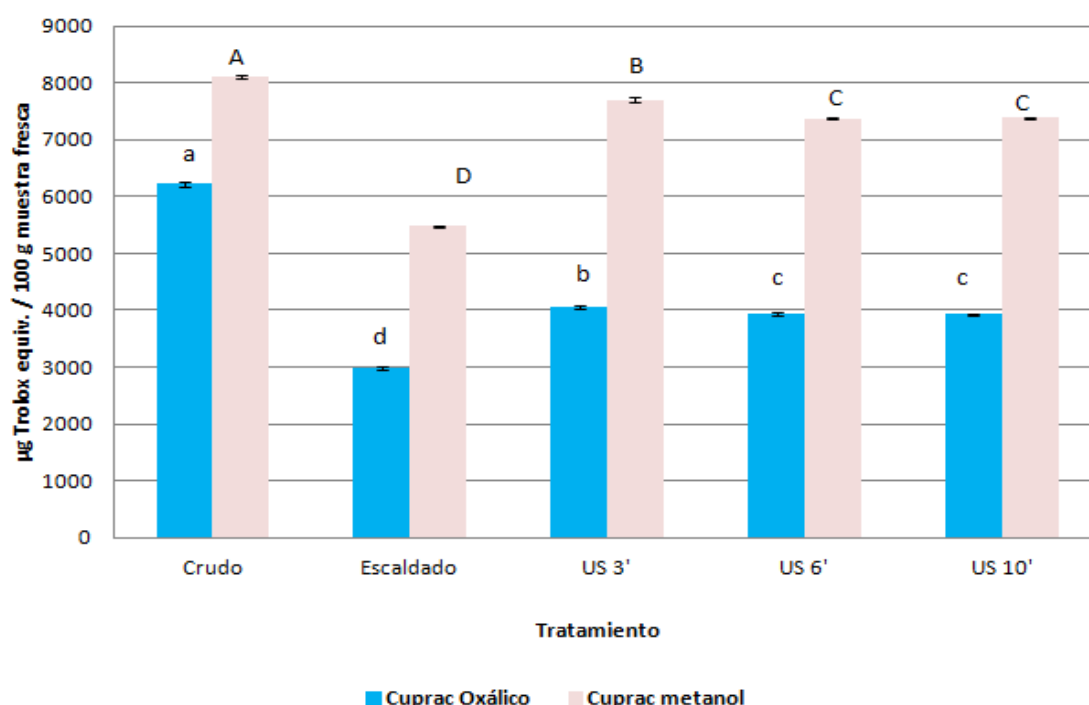


Figura 17. Capacidad antioxidante del brócoli mediante el método de Cuprac
Media de cada tratamiento seguida de letra de significación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Extracción con oxálico (a, b, c, d). Extracción con metanol (A, B, C, D)

La pérdida de capacidad antioxidantes es causado por las condiciones en la que están sometidas las muestras de brócoli durante el tratamiento, como el incremento de temperatura, el tipo de cocción (convencional, al vapor, microondas, etc.), el tiempo de cocción y la cantidad de agua. Se manifestó que la cocción redujo drásticamente el contenido de vitamina C, y que esto fue debido a la oxidación, mientras que la pérdida de compuestos fenólicos fue por una difusión simple en el agua de cocción, esta pérdida de nutrientes dio como resultado la disminución la capacidad antioxidante (Cartea et al., 2011).

La actividad antioxidante total es el resultado de la acción de varios compuestos presentes, por lo que no es dependiente únicamente de los compuestos fenólicos, la actividad antioxidante de la muestra está dada por varios compuestos que pueden tener efectos sinérgicos. Por este motivo, es recomendable el uso de diferentes técnicas para su evaluación (Orjuela Rodriguez, 2015; Ryan Prescott, 2010).

Sulaiman, (2011) y Spigno, (2007) observaron que al evaluar las actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos es importante tener en cuenta la naturaleza del extractante (polaridad, soluciones acuosas de metanol, etanol, acetona y acetato de etilo) y las condiciones de la extracción (temperatura y pH), ya que de estos parámetros dependerá el rendimiento de la extracción.

4.6 Efecto de la extracción: oxálico *versus* metanol

La extracción con metanol comporta la obtención, en general, de resultados superiores a la extracción con ácido oxálico; especialmente en la muestra cruda y se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (escaldado < US) y US 3 min>US 6 min y US 10 min y sigue esta línea en ambos métodos Folin-Ciocalteu y CUPRAC. En la determinación de compuestos fenólicos en el metanol se observan valores ligeramente superiores en comparación con el oxálico, pero no son superiores al 10%. En la capacidad antioxidante se obtienen resultados superiores de casi el 50% en comparación con los resultados extraídos con oxálico. En ambos métodos de extracción Hay diferencias estadísticamente significativas siendo las diferencias superiores en el crudo e inferiores en el escaldado. En la tabla 9, se observan los resultados con las medias y desviación estándar de los tratamientos estudiados, en la determinación de compuestos fenólicos; en donde se muestran que existen diferencias significativas para la extracción con oxálico y la extracción con metanol.

Tabla 9. Comparación entre medios extractantes en la determinación de compuestos fenólicos

Determinación de compuestos fenólicos (Folin-Ciocalteu)					
Medio de Extracción	Crudo	Escaldado	US 3 min.	US 6 min.	US 10 min.
Oxálico	100.05±0.66 B	53.08 ± 1.10 B	93.86 ± 1.26 B	86.81 ± 1.34 B	88.15 ±1.13 B
Metanol	130.88 ±0.77 A	59.36 ±1.23 A	96.87 ± 1.34 A	90.64 ± 1.24 A	89.09 ± 1.12 A

Todos los valores son expresados como media ± DE de tres experimentos independientes analizados por triplicado (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas entre medios extractantes ($p<0.05$).

En la tabla 10, se muestran los resultados de la capacidad antioxidante, se puede observar las diferencias significativas entre cada tratamiento y tipo de extracción. Se interpreta que la diferencia entre los resultados obtenidos según el método de extracción está relacionado con la naturaleza y estructura del compuesto extraíble, grado de polimerización y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción (Bochi *et al.*, 2014; Sulaiman, 2011).

Tabla 10. Comparación entre medios extractantes en la determinación de capacidad antioxidante

Determinación de la capacidad antioxidante (Cuprac)					
Medio de Extracción	Crudo	Escaldado	US 3 min.	US 6 min.	US 10 min.
Oxálico	6232.7±43.5 B	2985.5 ± 17.5B	4053.7±31.1B	3932.7±25.3B	3930.3 ± 13.8B
Metanol	8110.64± 20.4 A	5474.9 ± 21.7A	7706.1±44.1A	7379.4±25.2A	7392.9±14.3A

Todos los valores son expresados como media ± DE de tres experimentos independientes analizados por triplicado (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas entre medios extractantes ($p<0.05$).

En el caso de la extracción con oxálico puede deberse a interferencias de enzimas oxidativas que no se inhiben y que pueden interferir en la determinación de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Bochi *et al.*, 2014).

La utilización de estos extractantes es debido a que el brócoli tiene un alto contenido de ácido ascórbico y de compuestos fenólicos, el mayoritario es la quercetina, ambos compuestos tienen elevada capacidad antioxidante. Aunque su solubilidad es diferente: El ácido ascórbico es hidrosoluble y la quercetina es poco soluble en agua. Por ello es necesario la utilización de dos soluciones extractantes diferentes.

El ácido oxálico 1% (w/v) estabiliza el ácido ascórbico y el metanol disuelve la quercetina.

5. CONCLUSIONES

De los resultados del presente estudio se extraen las siguientes conclusiones:

1. El uso de ultrasonidos en los tiempos utilizados en este estudio, no produce incrementos notorios de temperatura ni en el brócoli, ni en el agua del baño de ultrasonidos, lo que permite una mejor retención de los compuestos termo sensibles.
2. La aplicación de ultrasonidos en el brócoli, tiene repercusiones similares al escaldado (3 minutos) en lo referente a la concentración de ácido ascórbico. En ambos tratamientos se experimenta una reducción del 53%, independientemente del tiempo de aplicación en el caso de ultrasonidos (3, 6, 10 min).
3. En el escaldado el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se reducen alrededor de un 50%. Mientras que en los ultrasonidos, los niveles de pérdida son inferiores, reduciéndose alrededor de un 30% para los compuestos fenólicos y alrededor del 10% en la capacidad antioxidante. A mayor tiempo de aplicación de los ultrasonidos, menor contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante.
4. El tratamiento de ultrasonidos que menor pérdida de ácido ascórbico, mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante resulta es el de 3 minutos.

6. BIBLIOGRAFIA

Rodriguez M. C. (2013). *Respuestas fisiológicas, moleculares y fotoquímicas de variedades de Brassica oleracea var italica, sometidas a estrés abiótico*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Pascual A. (1994). Brócoli. Su cultivo y prospectivas. *Revista Horticultura*, 97, 34-37.

Moreno D. A., Carvajal M., López-Berenguer, C., Gracia-Viguera C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 41, 1808-1522.

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. In: USDA, Agricultural Research Service – National Agricultural Library, Nutrient Data Laboratory [online].

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference. (2019). <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>

Jin P., Yao D., Xu F., Wang H., Zheng Y. (2015). Effect of light on quality and bioactive compounds in postharvest broccoli florets. *Food Chemistry*, 172, 705 -710.

Fernández-León M.F., Fernández-León A. M. Lozano M., Ayuso M. C. y González-Gomez D. (2012). Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars. *Journal of Functional foods*, 4, 465-473.

Lipton W. J. (1987). Senescence in leafy vegetables. *HortScience*, 22, 854-859.

Dixon R. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.

Jones R.B., Faragher J. D. and Winkler S. (2006). A review of the influence of postharvest treatments of quality and glucosinolate content in broccoli heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41 1-8.

Costa L., Vicente A. R., Civello P. M. Chaves A. R., y Martinez G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and technology*, 39, 204-210.

Carreras, J.E. (2006) Cuarta gama una alternativa de futuro. <http://www.infoagro.com>

Cantwell M., y Suslow T. (2005). Broccoli. *Recommendation for maintaining postharvest quality*. Recuperada de <http://posthrvest.ucdavis.edu/pfvegetable/broccoli>

Santana B. P., Nedel F., Piva E., Carvalho R. V., Demarco F. F., Lenin N., Carreño V. (2013). Preparation, Modification and Characterization of Alginate Hydrogel with Nano /Microfibers. *A New Perspective for Tissue Engineering*.

ACSA. Agencia Catalana de Seguridad alimentaria (2018). http://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-

tecnicos/comite_cientific_assessor/publis/Mesures-rentat-fruita-verdura-Hipoclorit-sodi/Desinfeccion-de-frutas-y-hortalizas.-Els-uso-del-hipoclorito-sodico-rev.-0.pdf

Allende, A., Aguayo, E., Artés, F. (2004). Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *International Journal of Food Science and Technology*, 91: 109– 117.

Gil M., Selma M., López-Gálvez F., Allende A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology* 134. 37– 45.

Graham D., Wills R., McGlasson B., Joyce D. (1998). Postharvest. An introduction to the physiology & handling of fruit and vegetable. *UNSW Press*, 4(2), 262.

Ramos B., Miller F.A., Brandão T.R.S., Teixeira P., Silva C.L.M. (2013). Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20: 1–15.

Herrero M.A., Romero de Ávila M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista Medicina Universidad de Navarra*, Vol. 50, 71-74.

Arroyo S. C., Cebrián, G., Pagán, R., Condón, (2011). Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, 446–454.

Brown T., James S. J., Purnell G. L., (2005). Cutting forces in foods: experimental measurements. *Journal of Food Engineering*, vol. 70, pp. 165–170.

Bosiljkov T., (2009). Impact ultrasound-enhanced homogenization on physical properties of soybean milk, vol. 17, 1029–1034.

Demirdöven A. y Baysal, (2009). The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation," *Food Reviews International*, vol. 25, pp. 1–11.

Villamiel, M., y de Jong, P. (2000). Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 472-478, 3068.

Gogate P. R., Kadi A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering /biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72.

Alava JM, Sahi SS, García-Alvarez J, Turó A, Chávez JA, García MJ, Salazar J. (2007). Use of ultrasound for the determination of flour quality. *Ultrasonics*, 46, 270–76.

Mawson R., Gamage m., Terefe Shiferaw T., y Knoerzer K. (2010) Ultrasound in Enzyme Activation and Inactivation. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing* (369-404).

Ahmed J., Ramaswamy H. S., Kasapis S., Boye J. I., (2010). *Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties*. Florida, Estados Unidos de América. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Zheng L., Sun D. (2006). Aplicaciones innovadoras de la energía ultrasonido durante procesos de congelación de alimentos. *Tendencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 17-23.

Day L, Xu M, Oiseth SK, Mawson R (2012). Improved mechanical properties of retorted carrots by ultrasonic pre-treatments. *Ultrason Sonochem* (19):427-434.

Freitas Brilhante J., Andrade N. J., Mota Ramos A., Dantas Vanetti M. C., Stringheta P. C., Paes Chaves B. J., (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control* 45. 36-50.

Recuperado de:
http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Mtahghighat/tfood/ARTICLES/cereals/Decontamination_by_ultrasound_application_in_fresh_fruits_and.pdf.

Pingret D, Fabiano-Tixier A, Chemat F (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control* (31):593-606.

Hurtado Diaz, S. (2013). *Efecto de la aplicación de ultrasonidos en vegetales* (Proyecto final de carrera, Universidad Politécnica de Catalunya). Recuperado de <https://upcommons.upc.edu>.

Caballero Anento, A (2018). *Efecto de los ultrasonidos y soluciones ácidas en el oscurecimiento enzimático de la patata. (Solanum Tuberosum)*. (Proyecto final de carrera, Universidad Politécnica de Catalunya). Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/107335>.

Lifen Zhang, Shunan Zhao, Shaojuan Lai, Fusheng Chen, Hongshun Yang. E. (2018). Combined effects of ultrasound and calcium on the chelate-soluble pectin and quality of strawberries during storage. *Carbohydrate Polymers*, 8.

Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.013>.

Ginés Rodriguez, E. (2015). *Efecto de los ultrasonidos en el contenido de compuestos bioactivos en boniato (Ipomoea batatas) mínimamente procesado* (Proyecto final de carrera, Universidad Politécnica de Catalunya). Recuperado de <https://upcommons.upc.edu>.

Girbés, T., Jiménez, P. (2010). *Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Mason T. J., Paniwnyk L., Lorimer J. P., (1996). The Uses of Ultrasound on Food Technology, *Ultrasonics Sonochem*, 3, 250-259.

Brennam James G., (2008). *Manual del procesado de alimento*. ZARAGOZA. Acribia.

Santos, P. H. S., & Silva, M. A. (2008). Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables: A review. *Drying Technology*, 26, 1421-1437.

Gamboa Santos J. (2013) *Impacto de los ultrasonidos de potencia en la calidad de vegetales y frutas durante el proceso de deshidratación* (Tesis doctoral, Universidad autónoma de Madrid) Recuperado de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101594/1ultrasonidosdepotencia.pdf>

Spinola V., Mendes B., Cámara J., Catilho P. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *Food Science and Technology*, 50, 489-495.

Martin Garcia F. (2017) Comparación de la actividad antioxidante de diferentes vegetales y su variación tras los procesos habituales de preparación (Proyecto final de carrera, Universidad de Valladolid). Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/132344467.pdf>

Ninfali P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., y Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*, 93(2), 257. <https://doi.org/10.1079/BJN20041327>

Rothwell J. A., Perez-Jimenez J., Neveu V., Medina-Remón A. M., Hiri, N., García- Lobato P., Scalbert A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>

Yamaguchi, T., Katsuda, M., Oda, Y., Terao, J., Kanazawa, K., Oshima, S., Matoba, T. (2003). Influence of Polyphenol and Ascorbate Oxidases during Cooking Process on the Radical-Scavenging Activity of Vegetables. *Food ScienceTechnologic. Res*, 9(1), 79–83. Recuperado de https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/9/1/9_1_79/_pdf

Cartea M. E., Francisco M., Soengas P., & Velasco P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16, 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>

Vallejo, F., Tomas-Barberán F., García-Viguera A., (2003). El contenido de compuestos fenólicos en partes comestibles de inflorescencias de brócoli después de la cocción doméstica. *J. Science. Agriculture Food*. 83, 1511-1516.

Zhang, DL; Hamauzu, Y., (2004). Fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides y la actividad antioxidante de brócoli y sus cambios durante la cocción convencional y microondas. *Food Chemical*. 88, 503-509.

Ramešová S., Romana S., Degano LI., Bulícková J. (2011). On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 975-82.

Kähkönen M.P. Hopia A.T. Vuorela H.J. Rauha J. P. Pihlaja K. Kujala T. S. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.

Serrano M., Martinez- Romero D. Guillem F., Castillo s., Valero D. (2006). Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 61-68.

Orjuela Rodriguez A. A. (2015). *Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chromolaena perglabra (B.L. Robinson) R.M. King y H. Robinson*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.

Recuperado de <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/handle/11158/408>

Ryan L., Prescott, S. L. (2010). Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *International Journal of Food Science & Technology*.

Sulaiman S.F., Sajak A. A. B., Ooi K. L., Seow E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4):506-515.

Spigno G., Tramelli L., De Faveri D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200-208.

Bochi V. C., Barcia M. T., Rodriguez D., Speroni C. S.; Giusti M. M., Godoy H. T. (2014). Polyphenol extraction optimisation. *Food Chemistry* 164:347-354.